

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

J1002 U.S. PTO

09/944448



대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 특허출원 2001년 제 12485 호
Application Number PATENT-2001-0012485

출원 년 월 일 : 2001년 03월 10일
Date of Application MAR 10, 2001

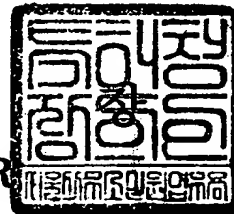
출원인 : (주)마리아 바이오텍
Applicant(s) MARIA BIOTECH



2001 년 07 월 26 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	출원인 명의변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.05.26
【구명의인】	
【성명】	박세필
【출원인코드】	4-2000-040176-6
【신명의인】	
【명칭】	(주)마리아 바이오텍
【출원인코드】	1-2001-021354-1
【대리인】	
【성명】	주성민
【대리인코드】	9-1998-000517-7
【대리인】	
【성명】	장수길
【대리인코드】	9-1998-000482-8
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0012485
【출원일자】	2001.03.10
【심사청구일자】	2001.03.10
【발명(고안)의 명칭】	동결 -용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터 의특 정 세포 분화 방법
【변경원인】	전부양도
【취지】	특허법 제38조4항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인 주 성민 (인) 대리인 장수길 (인)
【수수료】	13,000 원
【첨부서류】	1. 양도증_1통[사본: 원본은 동일자로 제출되는 특허 출원 제2000-508 81호의 출원인 명의변경 신고서에 첨부된 것을 원용함] 2. 인감증명서_1통[사본: 원본은 동일자로 제출되는 특허 출원 제2000 -50881호의 출원인 명의변경 신고서에 첨 부된 것을 원용함] 3. 위임장_1통[양도인의 위임장 사본: 원 본은 동일자로 제출되는 특허 출원 제2000-50881호의 출원 인 명의변경 신고서에 첨부된 것을 원용 함] 4. 위임장_1통[양수인의 위임장 사본: 원본은 동일자로 제출되는 특허 출 원 제2000-50881호의 출원인 명의변경 신고서에 첨부된 것 을 원용 함]

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.03.10
【발명의 명칭】	동결 -용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터 의 특정 세포 분화 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Differentiation of Specific Cells from Huma Embryonic Stem Cells Derived from Frozen-Thawed Blastocyst Stage Embryo
【출원인】	
【성명】	박세필
【출원인코드】	4-2000-040176-6
【대리인】	
【성명】	김영철
【대리인코드】	9-1998-000040-3
【포괄위임등록번호】	2000-048799-5
【대리인】	
【성명】	김순영
【대리인코드】	9-1998-000131-1
【포괄위임등록번호】	2000-048798-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김은영
【성명의 영문표기】	KIM,Eun Young
【주민등록번호】	640524-2566910
【우편번호】	138-223
【주소】	서울특별시 송파구 잠실3동 주공아파트 421동 409호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	박세필
【출원인코드】	4-2000-040176-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임진호
【성명의 영문표기】	LIM,Jin Ho
【주민등록번호】	540204-1008910

【우편번호】 130-110
【주소】 서울특별시 동대문구 신설동 103-11
【국적】 KR
【우선권주장】
【출원국명】 KR
【출원종류】 특허
【출원번호】 10-2000-0065629
【출원일자】 2000.11.06
【증명서류】 미첨부
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 김영철 (인) 대리인
 김순영 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 9 면 9,000 원
【우선권주장료】 1 건 26,000 원
【심사청구료】 10 항 429,000 원
【합계】 493,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 166,100 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 특정 세포의 분화 방법에 대한 것으로서, 본 발명에 의한 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법은, 동결된 인간의 배반포기 배를 용해하는 용해 단계; 상기 용해된 배반포기 배를 처리 및 세척하는 용해의 후처리 단계; 상기 후처리된 배반포기 배 중에서 영양 배엽 세포를 제거하고 내부 세포피만을 회수하는 절제 단계; 상기 내부 세포피를 분화 억제 인자 분비 세포주와 공동 배양하는 배양 단계; 및 상기 배양으로 회수된 배아 간세포를, 상기 내부 세포피의 공동 배양시 사용된 배양액에 성장 인자를 첨가하여 배양하는 분화 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법을 이용하면, 4년 이상의 장기간 동결된 5 내지 6일된 인간의 배반포기 배로부터 얻어진 배아 간세포로부터 원하는 특정 세포로 효과적으로 분화시킬 수가 있다. 이렇게 얻어진 심근 세포는 심근 경색 및 울혈성 심장 질환 등의 심장병을 치료하기 위해 널리 이용될 수 있다. 또한 얻어진 근육 세포는 근이양증 등의 치료를 위해 이용될 수 있고, 신경 세포는 뇌졸중, 파킨슨병 및 알츠하이머병 등의 치료를 위해 널리 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

STO 세포, 면역 절제술, 항-인간 림프구 항체, 심근 세포, 신경 세포, 근육 세포, 신경 보조 세포

【명세서】**【발명의 명칭】**

동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법
{Method for Differentiation of Specific Cells from Human Embryonic Stem Cells Derive
from Frozen-Thawed Blastocyst Stage Embryo}

【도면의 간단한 설명】

도1는 본 발명의 방법에 따라 심근 세포로 분화되고 있는 배아 간세포(embryonic stem cell; ES cell) 콜로니의 현미경 사진(X 40),

도2은 본 발명의 방법에 따른 심근 세포의 형성을 나타내는 현미경 사진(X 60),

도3는 본 발명의 방법에 따라 분화되어 박동 중인 심근 세포의 현미경 사진(X 100),

도4는 전형적인 뉴우런의 현미경 사진(X 100),

도5은 항-신경미세섬유 200kDa 단백질로 염색된 신경 세포의 현미경 사진(X 40),

도6은 항-미세소관 결합 단백질2로 염색된 신경 세포의 현미경 사진(X 600),

도7은 항- β 튜블린으로 염색된 신경 세포의 현미경 사진(X 600),

도8는 전형적인 아교 세포의 현미경 사진(X 100),

도9은 항-신경교원섬유산 단백질로 염색된 아교 세포의 현미경 사진(X 100),

도10은 항-갈락토셀레브로시드(galactocelbroside)로 염색된 신경 세포의 현미경 사진(X 200),

도11a 및 도11b는 항-근육 액틴으로 염색된 근육 세포(X 400),

도12은 유배아체(embryoid body; EB) 및 배아 간세포 콜로니에서의 Oct4 발현 정도를 비교하기 위한 전기영동의 결과,

도13는 배아 간세포 및 분화된 간세포 콜로니에서의 Oct4b의 발현 정도를 비교하기 위한 전기영동의 결과,

도14는 본 발명의 방법에 따라 형성된 인간의 배아 간세포를 동결-용해시킨 후 찍은 현미경 사진(X 60)이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<15> 본 발명은 배아 간세포로부터 심근 세포, 근육세포 및 신경세포 등의 특정 세포를 분화시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터 심근 세포, 근육세포 및 신경세포 등의 특정 세포를 분화시키는 방법에 관한 것이다.

<16> 배아 간세포(embryonic stem cell)의 유용성은 예전부터 알려져 왔지만 인간 배아로부터 간세포를 확립시킨 후 이를 이용하여 원하는 특정 세포로 분화시키는 방법에 대해서는 연구에 별 진전이 없었다. 그러다가 1998년에 최초로 인간 배아로부터 유도된 간세포의 확립 방법이 제임스 에이 톰슨 등에 의해 알려졌다(James A. Thomson et al. 282(5391):1145, Science지, 1998). 배아 간세포는 초기 포유동물

배아의 만능 세포로부터 유도되는 세포로서, 분화가 억제되고 증식만이 가능한 세포이다. 이들은 초기 인간의 배아 연구 뿐만 아니라, 신규한 성장 인자 및 의약의 개발, 질병의 치료, 이식 치료학 등에 널리 이용될 수 있다. 제임스 에이 톰슨 등은 수정 후 2 내지 3일된 난할 단계의 인간 배아를 부모의 동의 하에 배반포 단계로 배양하여 간세포를 얻는 방법을 기술하고 있다. 또한 제임스 에이 톰슨 등은 면역 결핍된 마우스(SCID 마우스)에 그 배아 간세포를 주입한 후 외배엽(신경과 피부세포), 중배엽(근육 조직, 연골 조직, 뼈) 및 내배엽(내장 상피 세포)으로의 분화 능력을 간접적인 분화 유도 방법을 통해 확인하였다. 그러나 시험관 수정 한 지 얼마 되지 않은 배아를 바로 사용해야 하는 것이므로, 불임 때문에 임신을 원하여 인공 수정을 한 부모들이 임신의 가능성이 있는 수정란을 제공하기란 용이한 일이 아니었다. 더구나 수정 후 2 내지 3일된 배아를 사용하였으므로 이를 배반포 단계까지 배양시켰을 경우 많은 수가 사멸하고 살아남는 배아의 수는 매우 한정적이라는 문제점이 있었다. 즉 사용하는 배아의 수에 비해 얻어지는 간세포의 수가 현저히 적은 문제점이 있었다. 또한 장기간 저장된 동결 배아들을 이용하여 간세포를 확립하고, 이렇게 확립된 간세포를 이용하여 원하는 특정 세포로 분화시키는 방법은 전혀 제시하지 못하였다.

- <17> 같은 해인 1998년에 존스 홉킨스 등에 의해 5주 내지 9주된 유산된 태아에서 분화되지 않은 원시 생식 세포를 배양함으로써 인간의 간세포를 얻는 방법이 발표되었다(Michael J. Shamblott et al. 95(23): 13726, PNAS지, 1998). 그러나 이는 수정 후 5주 내지 9주나 지난 태아로부터 유래한 간세포이므로, 질 높은 간세포

를 얻기가 어려운 단점이 있었다. 더구나 유산된 태아를 직접 이용하는 것이므로, 이 방법 역시 장기간 냉동 저장된 배아들로부터 간세포를 얻어 원하는 특정 세포로 분화시키는 방법은 제시하지 못하였다.

<18> 2000년도에 들어서 루비노프 등은, 수정 후 6일이 지난 배반포기 배를 배양함으로써 얻어진 배아 간세포에 대한 논문을 발표하였다(Benjamin E. Reubinoff et al, Nature 지, April 2000 Volume 18 Number 4 pp 399-404). 루비노프 등은 생체내 및 생체외 모두에서, 상기와 같이 수정 후 6일이 지난 배반포기 배를 배양함으로써 얻어진 배아 간세포로부터 원하는 특정 세포로의 분화가 가능함을 확인하였다. 생체내 배양으로는 면역 결핍된 마우스(SCID 마우스)에서 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화능력을 간접적인 분화 유도 방법을 통해 확인하였고, 생체외 배양으로는 신경 세포로의 분화 능력을 직접적인 분화 유도 배양 방법을 통해 확인하였다. 그러나 이것은 동결 배아가 아닌 생 배아를 이용하여 배아 간세포를 확립하고 이로부터 신경 세포 등으로 분화시킨 것이므로, 장기간 동결된 배아를 가지고 질 높은 배아 간세포를 얻은 후 이를 이용하여 원하는 특정 세포로 분화시킬 수 있는 효과적인 방법은 제시하지 못하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<19> 본 발명은 상기한 바와 같은, 종래 기술에 의한 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명의 목적은 수정 후 5 내지 6일된 인간의 배반포기 배를 동결하여 저장된 상태로 4년 이상의 시간이 지나서 폐기 처분되어야 하는 인간 배아로부터 간세포를 확립한 후 이를 이용하여 심근 세포, 근육세포 및 신경세포 등의 원하는 특정 세포로 분화시키는 효과적인 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <20> 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 의한 동결-융해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법은, 동결된 인간의 배반포기 배를 융해하는 융해 단계; 상기 융해된 배반포기 배를 처리 및 세척하는 융해의 후처리 단계; 상기 후처리된 배반포기 배 중에서 영양 배엽 세포를 제거하고 내부 세포괴만을 회수하는 절제 단계; 상기 내부 세포괴를 분화 억제 인자 분비 세포주와 공동 배양하는 배양 단계; 및 상기 배양으로 회수된 배아 간세포를, 상기 내부 세포괴의 공동 배양시 사용된 배양액에 성장 인자를 첨가하여 배양하는 분화 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <21> 상기한 본 발명에 의한 동결-융해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법에서, 상기 융해 단계의 동결된 인간의 배반포기 배는 동결 상태로 4년 이상 저장된 것임을 특징으로 한다.
- <22> 상기 본 발명에 의한 동결-융해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법에서, 상기 융해 단계의 동결된 인간의 배반포기 배는 시험관 수정 후 16 시간 내지 6일이 지난 배반포기 배를 동결시킨 것임을 특징으로 한다. 특히 바람직하게는 5 내지 6일된 배반포기 배를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- <23> 이하, 본 발명에 의한 분화 방법을 더욱 상세히 설명한다.
- <24> 본 발명에서 사용되는 인간의 수정란(또는 수정된 난자, 또는 배)은 불임 부모들을 임신시키기 위한 인간 시험관 아기(human IVF-ET) 프로그램으로부터 생산된 여분의 수정란을 4년 이상 동결 보관한 후 폐기될 운명에 처해 있는 배반포기 배 단계의 수정란이

다. 통상적으로 일반적인 불임 클리닉 등에서는 여분의 수정란을 추후에 다시 착상을 시도하기 위한 목적으로 동결 보관하여 저장한다. 그러나 4년 이상의 시간이 지나서도 부모의 착상 시도 의사가 없고, 환자와의 연락이 끊겨서 더이상 수정란을 보관할 필요가 없게 된 경우에는 통상 폐기 처분한다. 따라서 본 발명은 이러한 폐기 처분 대상의 수정란(배) 들을 이용하는 것이다. 그러나 폐기 처분의 대상이 아니라 하더라도, 부모의 허락이 있는 경우에는 사용할 수 있다.

<25> 또한 본 발명은 수정한 후 16시간 내지 6일 된, 더욱 바람직하게는 5 내지 6일 된 배반포기 단계의 수정란을 사용한다. 수정란 중 많은 수는 난할 등이 진행되면서 사멸된다. 따라서 종래의 2 내지 3일된 수정란을 이용하던 방법과는 달리, 5 내지 6일까지 생존하는 수정란만을 선택하여 이를 동결시킨 것을 사용하므로, 본 발명은 배아 간세포로 확립될 가능성이 종래 기술보다 훨씬 높다. 따라서 간세포를 얻는 데에 걸리는 시간과 비용을 절감할 수 있다.

<26> 본 발명은 시험관 아기 프로그램으로 얻은 5 내지 6일된 배를 난포액이 함유된 용액에 노출시킨 후, 동결 보호 및 삼투압을 위해서 글리세롤 및 수크로스를 함유한 용액에 노출한다. 그런 다음에 동결시킨 후 액체 질소에 보관한다. 그 후 4년 이상의 시간이 지나서, 그 중 폐기 처분 대상이 된 배를 용해시킨다.

<27> 용해할 때 주의할 점은 동해제를 효과적으로 제거해야 한다는 점이다. 본 발명은 동해제를 제거하기 위해 용해된 배반포기 배를 글리세롤과 수크로즈 농도를 단계적으로 낮추면서 다단계 처리를 한 후 인간 난포액으로 세척하여, 이 과정에서 살아 남은 배만을 세포 배양기에서 배양한다. 이러한 용해의 후처리 방법은 종래의 기술을 수정 보완한 것으로서, 동해제를 효과적으로 제거하면서 삼투압을 유지하므로 높은 안정성을 얻을

수 있다.

<28> 상기 단계를 마치면 배반포기 배의 외부에 존재하는 영양 배엽 세포를 제거하여야 한다. 영양 배엽 세포는 후에 태반으로 자라나는 부위로서, 배아 간세포를 얻기 위해 필요한 부위는 그 내부에 존재하는 내부 세포괴 세포(ICM 세포; inner cell mass cells)이기 때문이다. 융해의 후처리 후 생존한 배반포기 배에서 먼저 배를 둘러싸고 있는 투명대(zona pellucida)를 제거해야 한다. 이를 위해서는 프로나제(pronase)가 이용된다. 그 후 단백질 분해 효소의 독성을 제거하기 위해 충분히 배양시킨 후 토끼의 항-인간 림프구 항체(RAHLA)에 노출시킴으로써 항원 항체 반응을 유발하고, 다시 보체(complement)를 처리함으로써 영양 배엽 세포를 완전히 괴사시킨다.

<29> 본 발명의 또 다른 한 특징은 영양 배엽 세포의 절제를 위해 상기와 같이 항-인간 림프구 항체를 사용한다는 점이다. 종래 기술에서는 항-혈청 항체를 사용하였고, 본 발명과 같이 항-인간 림프구 항체를 간세포 제작에 사용한 적은 한번도 없었다. 상기 절제 단계에서 이용되는 항-인간 림프구 항체는 내부 세포괴 세포만을 회수하기 위해 만들어진 특이 시약이다. 항원으로서 인간의 혈액에서 림프구만을 회수하여, 이를 면역 증강제인 RIBI 보강제 또는 프론트 보강제와 혼합한 후, 토끼에 주사하여 얻어진 항체를 사용한다.

<30> 상기와 같이 하여 영양 배엽 세포가 괴사된 후 미세 피펫으로 내부 세포괴만을 회수하여 STO (mouse embryonic fibroblast) 세포 위에 놓고 공동 배양 시킨다. 배아 간세포를 얻기 위해서는 배반포기 배가 분화되지 않고 증식만을 하도록 해야 한다. 이를 위해서는 분화 억제와 관련된 여러 인자들을 배양 시에 첨가해 주어야 한다. STO 세포는 분화 억제 인자를 분비하는 세포주로서 통상 배아 간세포의 제작시 많이 사용되는 세포

이다. STO 세포 뿐만 아니라 백혈병 억제 인자(LIF; leukemia inhibitory factor)를 더 첨가하는 것이 바람직하다. STO 세포는 ATCC(American type culture collection)사로부터 상업적으로 구입할 수 있다. STO 세포는 2일에 한번씩 계대되며, 본 발명에서와 같이 내부 세포괴의 배양에 이용하기 위해서는 미토마이신-C를 처리한 후 회수된 세포를 드롭(drop)으로 제작하여 이용하는 것이 바람직하다.

<31> 배아 간세포인지의 여부를 판별하기 위해서는, 현미경을 이용한 여러 형태학적 관찰과 알칼라인 포스파타제 활성을 측정하는 것이 바람직하다. 간세포는 그 형태학적 특징들이 제임스 에이 톰슨 등에 의한 논문(Thomson et al. 282(5391):1145, Science지, 1998) 및 루비노프 등에 의한 논문(Reubinoff et al, Nature지, April 2000 Volume 18 Number 4 pp 399-404)에 자세히 기술되어 있으므로 이를 참고하여 판별할 수 있다. 더 정확한 판별을 위해서는 알칼라인 포스파타제 활성의 측정을 병행하는 것이 바람직하다. 이것은 알칼라인 포스파타제 활성에 의한 염색 정도를 관찰하여 간세포인지의 여부를 판별하는 방법이다. 간세포인 경우에만 염색이 되고, 분화된 세포는 염색이 되지 않는다.

<32> 상기 알칼라인 포스파타제 활성의 측정 이외에도, 배아 간세포인지의 여부를 판별하기 위해 Oct4의 발현 유무를 확인하는 방법이 있다. Oct4는 초기 배아와 생식선 그리고 배아 간세포에서 특징적으로 강하게 발현되는 인자로서 얼터네이티브 스플리싱(alternative splicing) 형태로 a 및 b 형태가 존재한다. 배아 간세포에서는 Oct4a 보다 Oct4b가 더 많이 발현되는데, 이는 도13에 나타나 있다. 또한 Oct4b는 배아 간세포 콜로니(B, C 및 D; 4 내지 12레인)에서는 나타나지만 유배아체(A; 1 내지 3레인)(도13) 또는 분화된 콜로니(도14)에서는 나타나지 않는다. 도13에는 유배아체(embryoid body; EB) 및 배아 간세포 콜로니에서의 Oct4 발현 정도를 비교하기 위한 전기영동의 결과가 나타

나 있다. A는 유배아체의 경우를, B 내지 D는 배아 간세포의 경우를 나타낸다. 도14는 배아 간세포(S1, S2) 및 분화된 간세포(D1, D2) 콜로니에서의 Oct4b의 발현 정도를 비교하기 위한 전기영동의 결과를 나타낸 것이다. 도14에 나타난 바와 같이, 분화된 간세포에서는 Oct4b가 발현되지 않고, 분화되지 않은 간세포에서만 Oct4b가 발현되는 것을 알 수 있다. 따라서 Oct4의 발현 유무로서 간세포임을 확인할 수 있다.

<33> 이렇게 얻어진 배아 간세포는 그 의학적 적용 가능 분야가 다양하다. 당뇨병 치료를 위해서 인슐린 생산 세포로 분화시킬 수 있고, 뇌졸중, 파킨슨씨병 및 알츠하이머병 등의 치료를 위해서 신경 세포로 분화시킬 수도 있다. 또한 간염 및 간경변의 치료를 위해 간세포(liver cell)로 분화시킬 수 있고, 암 및 면역 결핍 등을 치료하기 위해 혈액 세포로 분화시킬 수도 있다. 뿐만 아니라, 골다공증을 위해 골세포로, 화상 치료를 위해 피부 세포로, 그리고 근이양종의 치료를 위해서는 근육 세포로 분화시킬 수도 있다. 특히, 본 발명의 동결-융해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 심근 세포 분화 방법에 따라, 심근 경색 및 울혈성 심장 질환 등의 치료를 위해 심근 세포로 분화시킬 수도 있다.

<34> 하기에서는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 본 발명의 바람직한 일실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적일 뿐, 본 발명의 권리 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

<35> <실시예>

<36> 배반포기 배의 동결

<37> 인간 시험관 아기 프로그램으로부터 생산된 여분의 5 내지 6일된 배반포기 단계의

수정란을 20% 인간 난포액(hFF)이 함유된 용액에 10분간 노출시킨 후, 20% hFF와 5% 글리세롤을 함유한 용액으로 다시 10분간 처리하였다. 그 후 20% hFF, 9% 글리세롤 및 0.2M의 수크로스를 함유한 용액에 다시 10분간 노출시킨 후 액체 질소에 보관하였다.

<38> 동결된 배반포기 배의 융해

<39> 상기와 같이 처리된 배반포기 배를 4년 이상 동결 보관한 후에 폐기 대상이 된 배를 융해하여, 융해된 배반포기 배를 20% hFF, 5% 글리세롤 및 0.4M의 수크로스를 함유한 용액에 5분간 처리한 후, 다시 20% hFF, 3% 글리세롤 및 0.2M의 수크로스를 함유한 용액에 5분간 처리하였다. 그 후에 다시 20% hFF, 1% 글리세롤 및 0.2M의 수크로스를 함유한 용액에 5분간 처리한 후, 20% hFF 및 0.2M의 수크로스를 함유한 용액에 2분간 처리하였다. 여기에 다시 20% hFF를 함유한 용액으로 5분간 처리한 후 이 과정에서 생존한 배를 24시간세포 배양기에서 배양하였다.

<40> 토끼의 항-인간 림프구 항체(RAHLA)의 제조

<41> 토끼에게 인간의 림프구를 RIBI immunochem research. Inc.사로부터 구입한 보강제(R-700) 및 프룬트 보강제와 혼합한 다음 이를 2주 간격으로 4회 주사한 후 마지막 주사일로부터 10일이 지난 후에 토끼의 심장으로부터 항체를 회수하였다.

<42> 면역 절제술을 이용한 ICM 세포의 회수

<43> 상기 세포 배양기에서 24시간 배양한 배반포기 배를 0.3% Fraction-V BSA 또는 10% FBS를 함유한 TL-Hepes를 기본 용액으로 하여 0.25%의 프로나제(Sigma)로 처리한 후, 상기 얻어진 토끼의 항체(RAHLA)에 15분간 노출시킨 다음, 정상 기니피그 혈청으로부터 얻은 보체로 30분간 처리하였다.

<44> STO 세포의 준비

<45> 이렇게 얻어진 내부 세포괴와 공동 배양하기 위해서, ATCC사로부터 구입한 STO 세포를 준비하였다. 먼저 동결된 STO 세포를 20초간 공기를 처리한 후에 완전히 용해될 때까지 36.5℃ 물에 넣었다가 데워진 HBSS 또는 STO 배양액 9ml를 천천히 혼합하였다. 이것을 1000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고 데워진 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medim) 배양액 3ml에 재현탁한 후 25-T 배양 플라스크에서 배양하였다. 배양 용기에서 2일에 한번씩 계대하였다.

<46> 회수된 STO 세포를 이용한 피더(feeder) 세포 드롭의 제조

<47> 배양 플라스크에서 STO 세포의 컨플루언스(confluence)를 확인한 후, PBS 용액으로 세척하고, DMEM-미토마이신C에 약 2시간 30분간 처리한 후, PBS 용액으로 3회 세척하고, 2 내지 3분간 트립신으로 처리하였다. 이를 데워진 HBSS 용액 5ml로 세척하고 1000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 HBSS 용액 5ml에 재현탁하였다. 이를 다시 1000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 DMEM-LIF 용액 1ml에 재현탁하였다. 그 후 트리판(trypan) 블루(1:1) 및 헤마토사이토미터 계수 챔버를 이용하여 세포를 계수한 후 재현탁 및 시딩을 거쳐 배양하였다.

<48> ICM 세포의 배양 및 계대 배양

<49> 상기 회수된 ICM 세포를 미세 피펫을 이용하여 상기 얻어진 STO 세포 드롭 위에 놓고 신선한 DMEM-LIF 용액 2000유닛/ml로 매일 교체하면서 배양하였다. 배양 후 형성된 내부 세포괴 덩어리는 새로운 STO 드롭으로 옮겨서 배양하였다. 이와 같은 내부 세포괴 덩어리는 여러 덩어리로 나누어 대략 7일에 한 번 정도 새로운 STO 드롭에서 배양하였다

<50> 배아 간세포의 확인

<51> 제임스 에이 톰슨 등에 의한 논문(Thomson et al. 282(5391):1145, Science지, 1998) 및 루비노프 등에 의한 논문(Reubinoff et al, Nature지, April 2000 Volume 18 Number 4 pp 399-404)에 근거하여 현미경을 이용한 형태학적 관찰을 통해 배아 간세포를 확인하였다. 또한 세포를 4%의 포르말데히드에서 15분간 고정시키고 멸균 증류수로 3회 세척한 후, Sigma Chemical Co.사로부터 구입한 Fast Red TR/Naphthol AS-MX 용액을 이용하여 15 내지 30분간 염색한 후 그 염색 정도를 관찰하였다.

<52> 이와 병행하여, Takeda 등의 논문에 근거하여 Oct4에 대한 프라이머를 준비하였다. 안티센스 프라이머로는 Oct4a, Oct4b 모두 5'-CCACATCGGCCTGTGTATAT-3'를, 센스 프라이머로는 Oct4a의 경우 5'-CTCCTGGAGGGCCAGGAATC-3', Oct4b의 경우 5'-ATGCATGAGTCAGTGAACAG-3'를 준비하였다. 이 프라이머들은 전체 세포 추출(whole cell extraction) 과정을 통해서 추출된 배아 간세포 콜로니로부터 얻은 RNA를 역전사합으로 써 얻어진 cDNA과 함께 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 그리고 72℃에서 PCR을 1분간씩 35회 실시하였다. 증폭된 산물은 1%의 아가로스 젤에서 에티디움 브로마이드 염색으로 확인하였으며, 이미지 분석기(Biorad)에서 조사하였다. 이러한 방법을 통해 Oct4a 및 Oct4b의 발현 정도를 측정하였다.

<53> 상기 실험으로 하기 표1과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

<54>

【표 1】

용해된 배반포기 배의 수	6
용해 후처리 후 생존한 배반포기 배의 수	5
면역 절제술의 대상이 된 배의 수	4
배지에 플레이팅된 ICM의 수	4
부착된 ICM의 수	2
상기 ICM으로부터 형성된 콜로니의 수	2
5-6회 계대 배양된 수	2

<55> 상기 표1에 나타나는 바와 같이, 총 6개의 용해된 배반포기 배로부터 면역절제술에 이용될 수 있는 4개의 배를 얻었고, 영양 배엽 세포로부터 성공적으로 분리된 4개의 ICM 2개가 자리잡아 콜로니를 형성하였으며, 이 2개의 콜로니를 여러개로 나누어 재 배양한 결과 대부분의 ICM은 5 내지 6회(면역 절제 후 45 내지 50일) 계대되는 동안 분화되지 않고 계속 증식하였다. 이러한 ICM의 발달 양상은 현미경 하에서 매일 관찰한 결과 상기 논문들에 보고된 바와 일치함을 관찰할 수 있었다. 또한 알칼라인 포스파타제 활성 측정 결과 일부 분화가 이루어진 콜로니의 경우는 염색이 확인되지 않는 반면, 콜로니를 형성하면서 계속 발달된 대부분의 경우는 강력한 염색 반응을 관찰할 수 있었다. 그리고, Oct4의 발현에 대해 확인한 결과, Oct4b는 배아 간세포에서는 발현되지만 분화된 세포 형태인 유배아체나 분화된 콜로니에서는 발현되지 않음을 확인하였다.

<56> 특정 세포로의 분화

<57> 상기 단계에서 배아 간세포로 확인된 세포에, 상기 내부 세포피의 배양에 사용된, L-글루타민, 비 필수 아미노산 및 20% FBS를 포함하는 기본 배양액에 다수의 성장 인자를 첨가하였다. 심근 세포로의 분화는 분화 과정 중에 있는 콜로니에 1 μ M의 레티노산

(RA)을 첨가하여 유도하였다. 그 결과는 도1 내지 도3에 나타나 있다.

<58> 신경 세포로의 분화를 위해서는 유배아체나 분화 과정 중에 있는 콜로니에 $1\mu\text{M}$ 의 레티노산(RA), 10ng/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 100ng/ml의 신경 성장인자(NGF)를 단독 또는 병용 첨가하여 배양하였다. 배양액은 매일 교체해주었다.

<59> 또한 근육 세포로의 분화는 상기 심근 세포의 분화 조건에서 확인되었다.

<60> 특정 세포 분화의 확인

<61> 상기 모든 특정 세포로의 분화는 1차적으로 형태학적인 측면에서 확인되었다. 심근 세포의 경우에, 도3에 나타난 바와 같이, 1분에 60회 이상의 규칙적인 심박수(routine heart-beat)를 보이는 형태학적 특징을 통해 확인하였다.

<62> 2차적으로는 면역세포화학적 염색 방법을 통해 확인되었다. 신경 세포임을 확인하기 위해서 신경미세섬유 200kDa 단백질(NF200)(Sigma), 미세소관 결합 단백질 2(MAP2)(Sigma) 및 β -튜블린(Sigma)에 대한 모노클로날 항체를 이용하였다. 이에 대해 도5 내지 도7에 나타나 있다. 또한 신경교원섬유산 단백질(GFAP) 및 갈락토셀레브로시드(GalC)에 대한 폴리클로날 항체를 이용하였다. 이에 대해 도8 내지 도10에 나타나 있다. 그리고 근육 세포의 특성을 확인하기 위해서는 근육 액틴(Sigma)에 대한 특이성이 있는 모노클로날 항체를 이용하였고(도11a 및 11b), 각각의 항체에 대한 반응 정도를 확인하기 위해서는 FITC가 붙은 2차 항체를 준비하였다. 염색을 위한 전과정은 4°C 에서 실행하였다. 이 방법은 루비노프 등의 방법에 근거하였다.

<63> 배아 간세포의 동결 보존 및 용해

<64> 배아 간세포의 장기간 보존 가능성을 알아보기 위해 동결을 실시하였다. 배아 간세

포의 동결에 필요한 동결액은 배아 간세포의 배양액에 10% DMSO를 첨가하여 필터한 후 사용하였고, 동결액에 대한 독성을 줄이기 위해서 배아 간세포 콜로니를 동결액이 들어 있는 동결 튜브에 직접 넣었으며, 동결은 -20°C 에서 2시간 정치한 후 -70°C 에서 보관하였다. 융해시 배아 간세포가 들어 있는 동결 튜브는 36°C 수조에서 완전히 융해하였으며, 동결 튜브 안에 있는 내용물은 배아 간세포 배양액에 넣어 동해제를 제거하였고, 회수된 배아 간세포 덩어리는 곧 바로 배양 용기에 넣어 그 생존능을 조사하였다. 도14에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의해 형성된 배아 간세포가 동결-융해 후에도 여전히 생존가능함이 입증되었다.

【발명의 효과】

<65> 본 발명의 동결-융해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법을 이용하면, 4년 이상의 장기간 동결된 5 내지 6일된 인간의 배반포기 배로부터 얻어진 배아 간세포로부터 원하는 특정 세포로 효과적으로 분화시킬 수가 있다. 이렇게 얻어진 심근 세포는 심근 경색 및 울혈성 심장 질환 등의 심장병을 치료하기 위해 널리 이용될 수 있다. 또한 얻어진 근육 세포는 근이양종 등의 치료를 위해 이용될 수 있고, 신경 세포는 뇌졸중, 파킨슨병 및 알츠하이머병 등의 치료를 위해 널리 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

동결된 인간의 배반포기 배를 용해하는 용해 단계;

상기 용해된 배반포기 배를 처리 및 세척하는 용해의 후처리 단계;

상기 후처리된 배반포기 배 중에서 영양 배엽 세포를 제거하고 내부 세포괴만을 회수하는 절제 단계;

상기 내부 세포괴를 분화 억제 인자 분비 세포주와 공동 배양하는 배양 단계; 및

상기 배양으로 회수된 배아 간세포를, 상기 내부 세포괴의 공동 배양시 사용된 배양액에 성장 인자를 첨가하여 배양하는 분화 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 용해 단계의 동결된 인간의 배반포기 배는 동결 상태로 4년 이상 저장된 것임을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 용해 단계의 동결된 인간의 배반포기 배는 시험관 수정 후 16시간 내지 6일이 지난 배반포기 배를 동결시킨 것임을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 용해 단계의 동결된 인간의 배반포기 배는 시험관 수정 후

5 내지 6일이 지난 배반포기 배를 동결시킨 것임을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 5】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 특정 세포는 신경 세포 또는 신경 보조 세포이고,

상기 분화 단계는, 상기 성장 인자 이외에, 레티노산, 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF) 및 신경 성장인자(NGF)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 더 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 6】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 특정 세포는 심근 세포 또는 근육 세포이고,

상기 분화 단계는, 상기 성장 인자 이외에, 레티노산을 더 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 7】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 분화 단계 이후에, 특정 세포에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 면역화학적 세포염색 방법을 통해 특정 세포임을 확인하는 분화 확인 단계를 더 포함하는 것을

특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 특정 세포는 신경 세포이고, 상기 항체는 신경미세섬유 단백질(NF 200), 미세소관 결합 단백질(MAP 2) 및 β -튜블린 중 어느 하나에 대한 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 9】

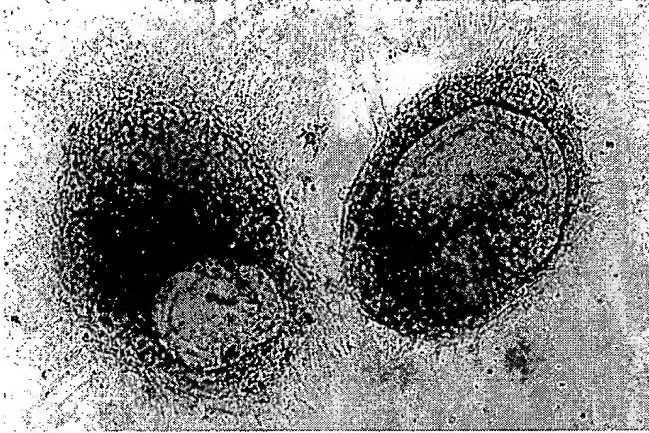
제 7 항에 있어서, 상기 특정 세포는 신경 보조 세포이고, 상기 항체는 신경교원섬유산 단백질(GFAP) 또는 갈락토셀레브로시드(GalC)에 대한 폴리클로날 항체인 것을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【청구항 10】

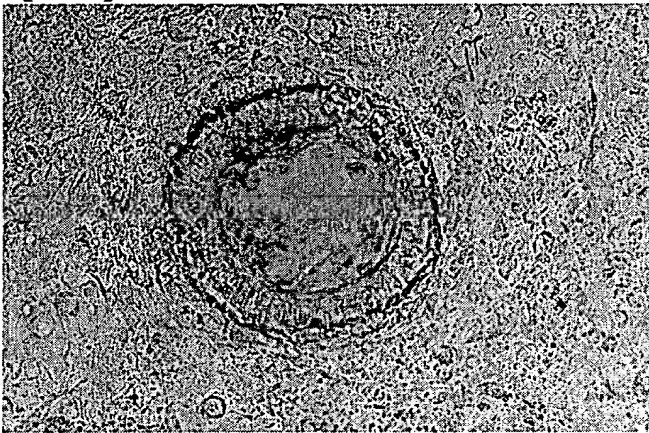
제 7 항에 있어서, 상기 특정 세포는 근육 세포이고, 상기 항체는 근육 특이적 액틴에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 동결-용해된 인간 배반포기 배 유래의 배아 간세포로부터의 특정 세포 분화 방법.

【도면】

【도 1】



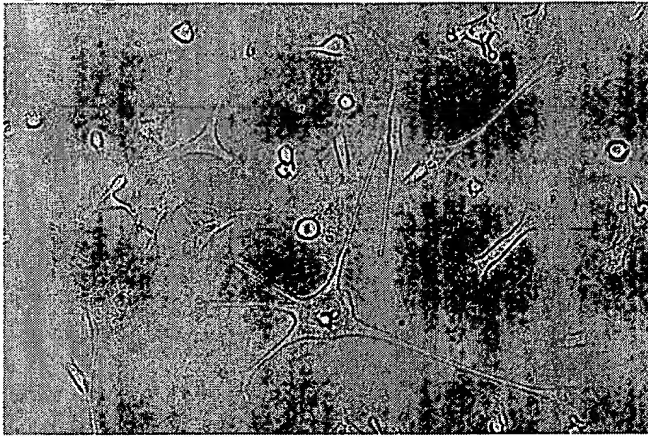
【도 2】



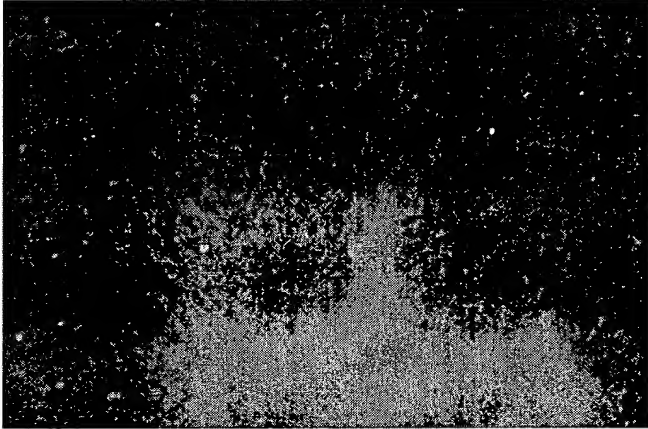
【도 3】



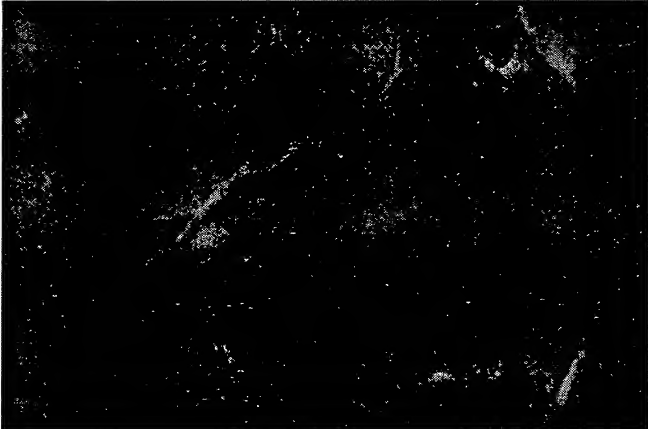
【도 4】



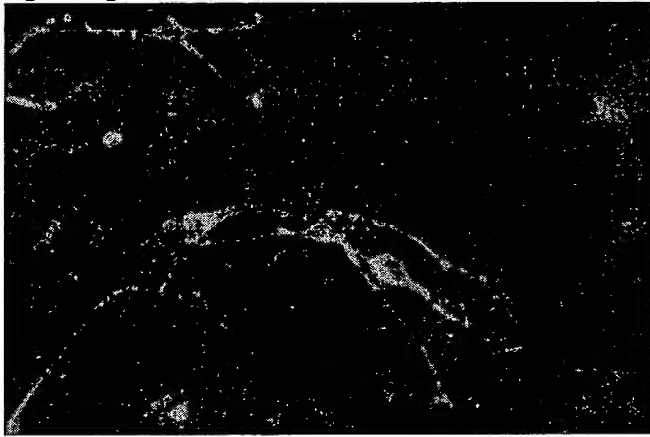
【도 5】



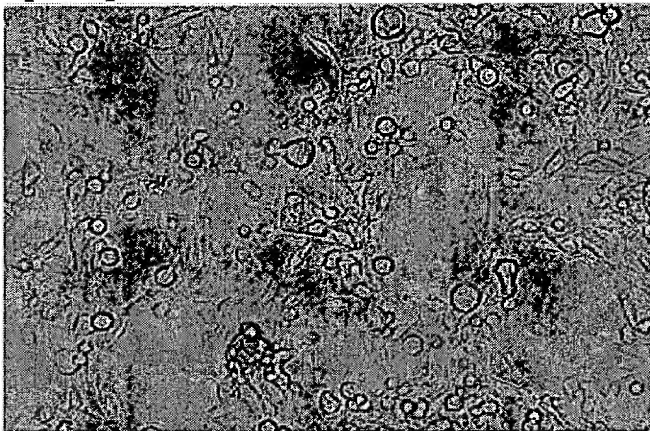
【도 6】



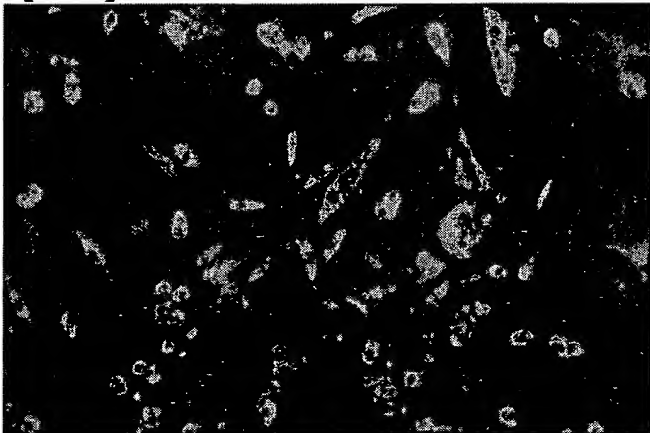
【도 7】



【도 8】



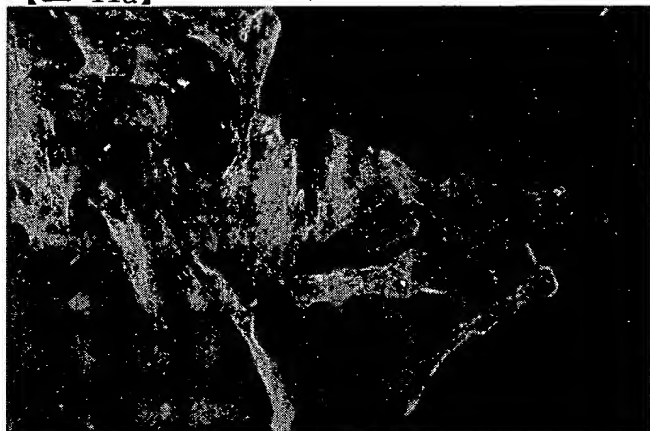
【도 9】



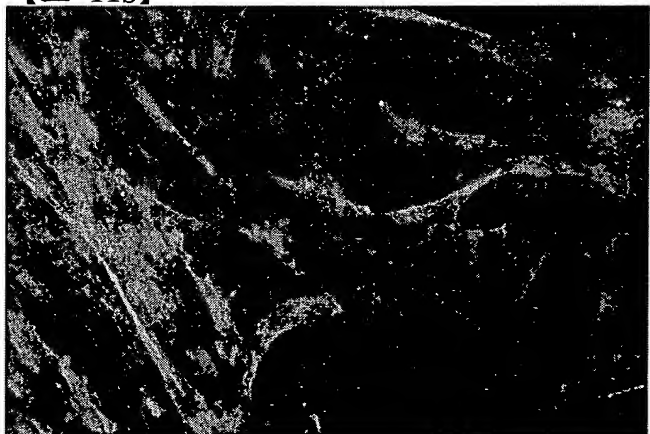
【도 10】



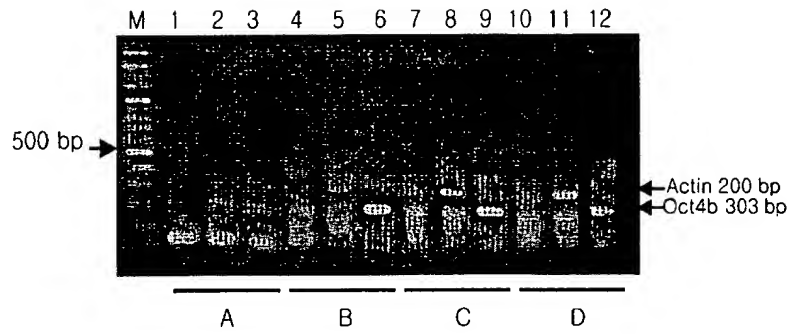
【도 11a】



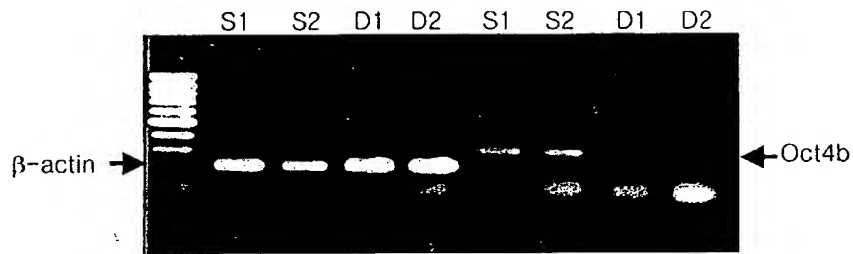
【도 11b】



【도 12】



【도 13】



【도 14】

